

PARAMETER KINETIKA INAKTIVASI TERMAL DAN ISOLASI *Staphylococcus aureus* PADA MINUMAN DARI GEL CINCAU HIJAU DAN ROSELA

[*Thermal Inactivation Kinetics Parameter and Isolation of Staphylococcus aureus on Drink from Green Grass Jelly and Roselle*]

Eko Hari Purnomo^{1,2)*}, Puspo Edi Giriwono^{1,2)}, Dias Indrasti^{1,2)}, Antung Sima Firleyanti^{1,2)}, dan Andini Giwang Kinasih¹⁾

¹⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor
²⁾ Southeast Asian Food and Agriculture Science and Technology (SEAFST), Bogor

Diterima 06 April 2015 / Disetujui 26 Juni 2015

ABSTRACT

Information about heat resistance (*D* and *z* values) of target bacteria is needed for the thermal process design on drink from Green Grass Jelly (*Premna oblongifolia* Merr.) and Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), so it can guarantee quality and safety of the product. The objectives of this research were to isolate *Staphylococcus aureus* from commercial green grass jelly and to determine the *D* and *z* values of *Staphylococcus aureus* (from commercial product and standard clinical isolate ATCC 25923) on heating menstruum of green grass jelly and roselle. Isolation of *S. aureus* was done by inoculation in selective medium, *D* and *z* values of *Staphylococcus aureus* were assessed by heating at constant temperatures of 57, 53, 49, and 45°C during the time interval 2.5, 5, 10, and 15 minutes. The results showed that one isolate (Isolate A) gave positive response of *Staphylococcus aureus* in isolation tests and had similar percentage with the reference culture of 41.8% using the API Staph Kit. Heat resistance of *Staphylococcus aureus* (represented as *D* value) isolated from green grass jelly at constant heating temperature of *D*₄₅, *D*₄₉, *D*₅₃ and *D*₅₇ were 32.3, 17.9, 4.6, and 1.5 minutes. On the other hand, *D* value of isolates ATCC 25923 (standard clinical isolate) at constant heating temperature of *D*₄₅, *D*₄₉, *D*₅₃ and *D*₅₇ were 18.5, 6.8, 2.9, and 1.4 minutes. The *z* value of isolates A and ATCC 25923 were 8.8°C and 10.8°C. Smaller *z* value of isolate A showed that pasteurization process can be accelerated and optimized with increasing the temperature slightly but has the same lethality effect.

Keywords: *D* value, green grass jelly, roselle, *Staphylococcus aureus*, *z* value

ABSTRAK

Informasi mengenai ketahanan panas (nilai *D* dan *z*) bakteri target diperlukan dalam desain proses termal terhadap minuman yang terbuat dari gel cincau hijau (*Premna oblongifolia* Merr.) dan rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.) sehingga dapat menjamin mutu dan keamanan produk. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi *Staphylococcus aureus* dari gel cincau hijau komersial dan menentukan nilai *D* dan *z* *Staphylococcus aureus* (isolat asal cincau hijau dan isolat klinis ATCC 25923) pada *heating menstruum* minuman dari gel cincau hijau dan rosela. Isolasi *S. aureus* dilakukan dengan penanaman pada medium selektif. Nilai *D* dan *z* *Staphylococcus aureus* diuji dengan panas pada suhu konstan 57, 53, 49, dan 45°C selama interval waktu 2,5; 5; 10; dan 15 menit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat A menunjukkan hasil positif *Staphylococcus aureus* pada pengujian isolasi dan memiliki persentase kesamaan dengan kultur referensi 41,8% menggunakan kit API Staph. Ketahanan panas *Staphylococcus aureus* (direpresentasikan sebagai nilai *D*) yang diisolasi dari gel cincau hijau pada suhu pemanasan konstan *D*₄₅, *D*₄₉, *D*₅₃ dan *D*₅₇ yaitu sebesar 32,3; 17,9; 4,6; dan 1,5 menit secara berurutan. Disisi lain, nilai *D* dari isolat ATCC 25923 pada suhu pemanasan konstan *D*₄₅, *D*₄₉, *D*₅₃ dan *D*₅₇ adalah 18,5; 6,8; 2,9; dan 1,4 menit secara berurutan. Nilai *z* dari isolat *Staphylococcus aureus* A dan isolat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah 8,8°C dan 10,8°C. Nilai *z* yang lebih kecil pada isolate *S. aureus* A menunjukkan bahwa proses pasteurisasi dapat dipercepat dan dioptimalkan dengan peningkatan suhu yang tidak terlalu besar namun efek letalitas yang sama.

Kata kunci: gel cincau hijau, nilai *D*, nilai *z*, rosela, *Staphylococcus aureus*

*Penulis Korespondensi :
Email: ekohari_p@yahoo.com

PENDAHULUAN

Saat ini, terjadi peningkatan permintaan masyarakat terhadap produk pangan fungsional. Salah satu produk pangan fungsional yang sudah banyak diteliti dan mulai dikonsumsi oleh masyarakat adalah gel cincau hijau dan ekstrak bunga rosella (Sugito, 2011). Secara tradisional, daun cincau hijau (*Premna oblongifolia* Merr.) digunakan sebagai minuman penyegar dalam bentuk gel (Nurdin *et al.*, 2008). Kandungan komponen aktif yang terkandung dalam daun cincau hijau yaitu karotenoid, flavonoid, dan klorofil. Manfaat kesehatan dari konsumsi cincau hijau antara lain dapat menurunkan panas badan, mual-mual, dan gangguan pencernaan. Manfaat dari kandungan komponen aktif daun cincau hijau menyebabkan upaya pengembangan produk cincau sebagai sumber serat pangan mulai dikembangkan (Nurdin, 2007). Meskipun kaya akan manfaat, gel cincau hijau merupakan jenis pangan yang memiliki potensi dari aspek bahaya mikrobiologis. Potensi bahaya tersebut disebabkan tidak adanya proses pemanasan dalam pembuatan gel cincau hijau secara konvensional. Umumnya, pembuatan gel cincau hijau dilakukan dengan mengekstrak daun cincau menggunakan air dingin (Prangdimurti *et al.*, 2014).

Tanaman rosella merupakan jenis tanaman dengan bunga berwarna merah dan banyak dijumpai di Indonesia. Bagian dari bunga rosella yang dapat diolah menjadi produk pangan yaitu bagian kelopak bunga yang mengandung senyawa kimia antara lain antosianin, *gossypeptin*, glukosida, hibiscin, vitamin A, vitamin C, asam amino, asam organik, polisakarida, dan unsur-unsur lain yang diperlukan tubuh. Sementara komponen aktif yang terkandung dalam bunga rosella adalah saponin, flavonoid, kuinon, dan steroid (Darusman *et al.*, 2012). Manfaat kesehatan yang diperoleh melalui konsumsi rosella yaitu menurunkan kolesterol tinggi, hipertensi, mencegah gangguan jantung, mencegah kanker, sariawan, dan sembelit (Wijakusuma 2008 dan Atiqoh *et al.*, 2011). Berdasarkan manfaat kesehatan serta kandungan komponen aktif dalam rosella dan daun cincau hijau, maka dapat dikembangkan minuman dari gel cincau hijau dan rosella merupakan makanan pencuci mulut yang bermanfaat bagi kesehatan.

Selain manfaat bagi kesehatan yang ada pada pangan fungsional, keamanan pangan merupakan faktor utama yang tidak dapat diabaikan. Pengolahan pangan yang tepat perlu dilakukan untuk menjamin keamanan pangan konsumen. Kejadian keracunan makanan umumnya dapat terjadi salah satunya karena cemaran mikroba. *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu

mikroba jenis *Staphylococcus* sp. yang paling berbahaya karena dapat menyebabkan keracunan pangan apabila jumlahnya mencapai 10^5 - 10^6 /g makanan (Tille, 2012). Bakteri ini secara alami terdapat pada tubuh manusia, di udara, di lingkungan sekitar dan dapat mengkontaminasi makanan yang diolah dengan kondisi sanitasi tidak cukup baik. Proses pembuatan cincau hijau yang tidak menggunakan pemanasan dan budaya praktek hygiene yang rendah dapat menyebabkan kemungkinan cemaran mikrobiologis yang tinggi. Berdasarkan penelitian Pramitasari (2012), hasil analisis mikrobiologi terhadap 14 sampel cincau hijau memperlihatkan bahwa sampel cincau hijau mengandung total mikroba, *E. coli*, dan *Staphylococcus* sp. Berturut-turut sebesar: $1,6 \times 10^4$ - $2,4 \times 10^6$; $3,0 \times 10^2$ - $4,4 \times 10^3$, dan $2,5 \times 10^1$ - $2,0 \times 10^3$ CFU/g. Oleh karena itu, gel cincau hijau berpotensi mengandung jumlah mikroba yang tinggi disebabkan tidak adanya pemanasan dalam proses pembuatannya. Penelitian yang dilakukan oleh Handayani dan Werdiningsih (2010) menunjukkan bahwa produk cincau hijau dapat mengandung total mikroba hingga $7,2 \times 10^7$ CFU/mL dan positif mengandung *Salmonella-Shigella*.

Proses termal pasteurisasi cincau hijau dalam medium teh rosella kemasan dapat diaplikasikan untuk meningkatkan mutu dan keamanan produk minuman dari gel cincau hijau dan rosella. Hal ini karena proses termal merupakan metode pengawetan pangan yang mampu memproduksi produk pangan dengan umur simpan yang lebih panjang (Huang, 2013). Kecukupan proses pemanasan dalam produk pangan didasarkan pada ketahanan panas mikroba target yang dinyatakan dalam nilai D dan z (Sukasih *et al.*, 2009). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengisolasi mikroba target yaitu *Staphylococcus aureus* dari gel cincau hijau dan mengetahui parameter dalam kinetika inaktivasi termal (D dan z) *Staphylococcus aureus* selama proses pemanasan. Penelitian mengenai kinetika inaktivasi termal *Staphylococcus aureus* yang diisolasi langsung dari cincau hijau ini bermanfaat untuk menentukan parameter inaktivasi termal (D dan z) yang selanjutnya dapat digunakan sebagai bahan acuan dalam penetapan kecukupan proses termal selama pemanasan bahan pangan (Bahçeci and Acar, 2007). Parameter inaktivasi termal isolat *S.aureus* dari gel cincau hijau tersebut akan dibandingkan dengan referensi yaitu *S. aureus* yang diisolasi dari tubuh manusia. Hal ini karena setiap mikroba memiliki ketahanan panas yang berbeda tergantung pada medium pertumbuhannya (Krapf *et al.*, 2010).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan baku utama yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun cincau hijau segar yang diperoleh dari Dramaga, Bogor (Jawa Barat), kelopak bunga Rosela kering yang diperoleh dari supermarket Giant Dramaga, Bogor (Jawa Barat), serta gula pasir lokal yang diperoleh dari toko sekitar Kampus IPB, Dramaga.

Pembuatan gel cincau hijau

Daun cincau hijau (*Premna oblongifolia* Merr.) diperkecil ukurannya menjadi 3 x 1,5 cm², dihomogenisasi menggunakan blender (Philips, Indonesia) dengan air panas (100°C) dengan perbandingan 1 : 10 (w/v). Cincau hijau disaring dengan kain dan ditambahkan dengan 2% karagenan (Merck, Germany). Filtrat dicetak dan didinginkan dalam suhu 4°C selama 24 jam (Susantikarn, 2014)

Pembuatan teh rosela

Kelopak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.) diekstrak dengan air panas 100°C (rasio rosela: air adalah 1:62, W/V) selama 30 menit. Kemudian ekstrak disaring dengan kain setelah mencapai suhu ruang (30±2°C). Ekstrak rosela ditambah dengan gula pasir sebanyak 15 % (w/v) dan disimpan pada suhu 4°C (Susantikarn, 2014).

Pembuatan produk minuman dari gel cincau hijau dan rosela

Gel cincau hijau dicampurkan dengan ekstrak rosela dengan perbandingan 4:5 (b/b).

Penanaman pada media Baird Parker Agar (BPA) dan Egg Yolk Tellurite (EYT)

Isolasi *S. aureus* dilakukan menggunakan media BPA dan YET. Persiapan isolasi dilakukan dengan menimbang sebanyak 25 gram padatan cincau hijau, ditempatkan dalam plastik steril lalu ditambahkan larutan fisiologis NaCl 0,8% (Merck, Germany) sebanyak 225 mL. Homogenisasi dilakukan dengan alat *stomacher* (Seward *stomacher*®, United Kingdom). Larutan tersebut diencerkan kemudian diambil 1 mL untuk diinokulasikan pada tiga cawan yang berisi media BPA (Oxoid, England) dan EYT (Oxoid, England) masing-masing 0,4; 0,3; dan 0,3 mL. Suspensi kemudian diratakan dengan menggunakan *hockey stick* steril hingga suspensi mikroba di permukaan media tidak terlihat. Cawan diinkubasi dengan posisi terbalik pada suhu 35°C selama 45-48 jam menggunakan inkubator (Fischer scientific, United States). Setelah inkubasi, dilakukan pengamatan koloni *S. aureus* sebagai isolat yang mempunyai ciri khas berbentuk bundar, licin

dan halus, cembung, diameter 2-3 mm, berwarna abu-abu sampai hitam pekat, dan dikelilingi zona *opaque* dengan zona luar yang bening (*clear zone*) (Karlina *et al.*, 2013). Koloni *S. aureus* memiliki konsistensi seperti mentega bila disentuh dengan ose (Bennett dan Lancette, 2001).

Pewarnaan Gram

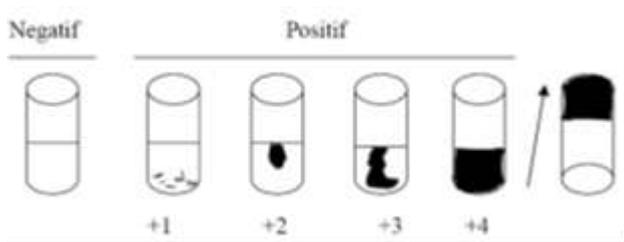
Metode pewarnaan Gram dilakukan dengan mengambil sedikit koloni terpisah pada media BPA dan EYT dengan ose lalu dioleskan pada gelas preparat. Preparat olesan bakteri difiksasi pada pembakar spiritus, ditetesi dengan larutan *Hucker's crystal violet* (Difto Bacto®, United States) selama 1 menit kemudian dicuci sebentar dengan air keringkan dengan tisu. Selanjutnya preparat ditetesi dengan larutan iodin (Merck, Germany) selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir, dan dikeringkan dengan tisu. Kemudian dekolorisasi dilakukan dengan meneteskan etanol 95% (Setiaguna Bogor, Indonesia) hingga seluruh warna biru hilang (kira-kira 30 detik). Preparat dicuci kembali dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya, preparat ditetesi dengan larutan *Hucker's counterstain* (safranin) (Merck, Germany) selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir, dan dikeringkan. Preparat diamati dibawah mikroskop (Olympus model CX21FS1, Jepang) dengan perbesaran 100x (BSN, 2011).

Uji katalase

Uji katalase dilakukan dengan mengambil satu ose inokulum yang telah disegarkan dan diletakkan di atas gelas preparat, kemudian tetesi dengan hidrogen peroksida (H₂O₂) (Merck, Germany) untuk melihat pembentukan gelembung-gelembung gas (Hardiningsih *et al.*, 2006). Reaksi positif ditandai dengan timbul banyak gelembung udara.

Uji koagulase

Koloni terduga *Staphylococcus aureus* diinokulasi ke dalam 0,2-0,3 mL *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) (Bacto™, United States) lalu diinokulasikan ke agar miring *Tryptose Soya Agar* (TSA) (Oxoid, England), dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 35°C. Selanjutnya sebanyak 0,5 mL koagulase plasma ditambahkan, diaduk dan inkubasi pada suhu 35°C. Tabung tersebut diamati setiap 6 jam sekali hingga 48 jam untuk melihat terbentuknya koagulan. Reaksi positif teramati bila tabung dibalik koagulan tidak jatuh karena terbentuk secara padat (+4) yang dapat dilihat pada Gambar 1. Tipe +2 dan +3 memerlukan uji konfirmasi lebih lanjut (Bennett dan Lancette, 2001).



Gambar 1. Tipe gumpalan pada uji koagulase

Penanaman pada media *Mannitol Salt Agar* (MSA)

Penanaman dengan MSA (Oxoid, England) dilakukan dengan cara mengambil satu ose inokulum dan digoreskankan pada media MSA, lalu diinkubasi pada 37°C selama 24 jam menggunakan inkubator (Heraeus electronic, Germany) (Dewi, 2013).

Pengujian dengan kit API staph

Pengujian dengan kit API Staph (Biomeieux, United States) dilakukan melalui tahapan: preparasi strip, preparasi inokulum, dan inokulasi (Koop *et al.*, 2012). Tahap preparasi strip dilakukan dengan pemberian sedikit air destilata steril pada tray kit API Staph untuk memberikan kelembaban selama inkubasi. Tahap preparasi inokulum dilakukan dengan menyegarkan isolat pada agar TSA yang diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 36°C (Yulvizar *et al.*, 2014). Tahap inokulasi dilakukan dengan inokulasi kultur yang berumur 18-24 jam ke API Staph medium. Selanjutnya inokulasikan 2 sampai 3 tetes suspensi bakteri pada masing-masing *microcupule*. Kit API Staph yang telah diinokulasikan bakteri kemudian ditutup dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 35–37°C dan diamati perubahan yang terjadi dengan memberikan tanda positif jika terjadi perubahan.

Persiapan inokulum

Staphylococcus aureus diperoleh dengan cara memindahkan kultur dari agar miring TSA dengan ose ke dalam 9 mL *Trypticase Soya Broth* (TSB) (Difco™, France) kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C. Pada fase Log akhir ini jumlah bakteri *Staphylococcus aureus* diperkirakan $1,0 \times 10^8$ – $1,0 \times 10^9$ CFU/mL.

Persiapan *heating menstruum*

Pembuatan *heating menstruum* dilakukan dengan memindahkan 9 mL media uji yang telah dihancurkan (minuman dari gel cinau hijau dan rosela) ke dalam erlenmeyer 50 mL. Media uji yang telah dibuat kemudian disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit menggunakan autoclave (ALP, Jepang) (Meliawaty, 2012).

Uji ketahanan panas

Prinsip uji ketahanan panas yaitu memanaskan sampel berisi isolat pada kombinasi suhu dan waktu tertentu (Sukasih *et al.*, 2009). Uji ketahanan panas dilakukan menggunakan lima buah Erlenmeyer. Satu erlenmeyer digunakan sebagai kontrol (ditempatkan termometer 100°C). Perlakuan suhu 57, 53, 49, dan 45°C akan diujikan pada dua isolat *Staphylococcus aureus* (hasil isolasi dan ATCC 25923). Masing-masing erlenmeyer berisi 9 mL minuman dari gel cinau hijau dan rosela yang telah steril dipanaskan dalam *waterbath shaker* (Polyscience Dual action shaker, United States) sesuai dengan suhu perlakuan. Setelah suhu tercapai, sebanyak 1 mL suspensi kultur yang telah mencapai fase Log akhir kemudian dimasukkan ke dalam 9 mL *heating menstruum*. Keempat erlenmeyer dipanaskan kembali dalam *waterbath shaker* kemudian dilakukan *holding* pada suhu 57, 53, 49, dan 45°C dengan interval waktu pencawanan masing-masing 2,5; 5; 10, dan 15 menit. Setelah pemanasan mencapai waktu tersebut, dilakukan pendinginan pada air mengalir untuk mencegah terjadinya pemanasan lanjutan dan dilakukan pengenceran dari 10^{-2} – 10^{-8} pada larutan pengencer. Pemupukan dilakukan pada media agar BPA dan EYT secara duplo dan selanjutnya inkubasi pada suhu 35°C (48 jam) (Shimamura *et al.*, 2006).

Pengamatan dan hitungan cawan

Cawan yang mengandung 20-200 koloni dipilih untuk penghitungan jumlah koloni (Bennett dan Lancette, 2001). Koloni *S. aureus* yang tumbuh pada BPA dan EYT dihitung dan dikalkulasi dengan rumus *Standard Plate Count* sebagai berikut:

$$N = E C / [(1 \cdot n_1) + (0,1 \cdot n_2) + \dots] \cdot (d)$$

Keterangan:

- N = Jumlah koloni per mL atau per gr produk
- EC = Jumlah semua koloni yang dihitung
- n_1 = Jumlah cawan pada pengenceran pertama
- n_2 = Jumlah cawan pada pengenceran kedua
- d = Pengenceran pertama yang dihitung

Penghitungan nilai D dan z

Penghitungan jumlah bakteri dinyatakan dalam satuan CFU/mL. Penghitungan Nilai D dilakukan dengan memplotkan grafik pertumbuhan bakteri dengan sumbu Y menyatakan jumlah koloni yang hidup (Log CFU) dan sumbu X menyatakan selang waktu setelah pemanasan pada empat suhu berbeda. Nilai D ditentukan sebagai waktu yang dibutuhkan untuk menurunkan jumlah mikroba sebesar satu siklus Log pada suhu konstan tertentu. Berdasarkan nilai D pada suhu percobaan dibuat kurva *thermal death time* (TDT) yang menunjukkan

hubungan antara nilai D (dalam menit) pada skala logaritmik dengan suhu ($^{\circ}\text{C}$). Penentuan nilai z diperoleh dari kurva semi-logaritmik yang berbentuk linear dengan slope $-1/z$ (Fraiha *et al.*, 2010).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi *Staphylococcus aureus* dari cinau hijau komersial

Tahapan isolasi bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan menggunakan media BPA dan YET yang berasal dari gel cinau hijau yang ada di pasaran. Hasil isolasi yang didapatkan menggunakan media BPA dan EYT adalah 9 jenis isolat yang diduga sebagai *S. aureus* yaitu kode isolat A, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, dan B8. Kode A menunjukkan bahwa isolat berasal dari gel cinau hijau di daerah Pasar Dramaga, sedangkan kode B menunjukkan gel cinau hijau yang diperoleh dari daerah Pasar Laladon. Hasil uji katalase dan pewarnaan Gram terhadap sembilan jenis isolate terduga *S. aureus* dicantumkan pada Tabel 1. Hasil uji pewarnaan Gram yang dilakukan pada isolat A dan B8 adalah berbentuk kokus, seragam, bewarna ungu violet, dan bersifat Gram positif (Tabel 1). Organisme yang bersifat Gram positif ditandai dengan warna biru gelap atau ungu (PHE, 2014). *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif berbentuk kokus, tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur seperti buah anggur, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora dan tidak bergerak (Tille, 2012 dan Purwohadisantoso *et al.*, 2009).

Hasil uji katalase terhadap isolat A dan B8 menunjukkan reaksi positif yang ditandai dengan timbulnya gelembung-gelembung udara (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa isolat A dan B8 diidentifikasi sebagai *S. aureus* karena *S. aureus* bersifat positif terhadap uji katalase serta bersifat Gram positif. Mikroorganisme ini mampu menghasilkan enzim katalase yang dapat mengkatalisis penguraian hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi H_2O dan O_2 (Tille, 2012). Hidrogen peroksida (H_2O_2) terbentuk sewaktu metabolisme aerob, sehingga mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob menguraikan senyawa tersebut (Huda *et al.*, 2012).

Tabel 2 menunjukkan hasil uji koagulase dan uji penanaman pada medium MSA empat jenis isolat: kontrol negatif, kontrol positif, A, dan B8. Hasil uji koagulase terhadap isolat A adalah koagulase positif (+2) dan isolate B koagulase positif (+1) yang ditunjukkan dengan adanya koagulan pada bagian atas dalam jumlah sedikit (Tabel 2). Koagulase adalah protein enzim yang diproduksi oleh mikroorganisme tertentu salah satunya *Staphylococcus*

aureus untuk mengkonversi fibrinogen menjadi fibrin (Tille, 2012). Koagulase mengikat plasma fibrinogen, menyebabkan mikroorganisme dapat menggumpalkan plasma (PHE, 2014). Hasil uji penanaman pada media MSA adalah positif terhadap bakteri *S. aureus* pada isolat kontrol positif, isolat A, dan B8 yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna pada media MSA dari merah menjadi kuning (Tabel 2). MSA merupakan media selektif dan differensial yang digunakan dalam isolasi *Staphylococcus* (Rosida dan Susiloningsih, 2007). *Staphylococcus* memiliki ketahanan terhadap tekanan osmotik oleh 7,5% NaCl dan dapat memfermentasi mannitol sehingga menghasilkan warna kuning pada media MSA (Shields dan Tsang, 2006). Apabila bakteri *staphylococci* bersifat koagulase positif dan dapat memfermentasi manitol pada MSA maka bakteri *staphylococci* tersebut adalah *Staphylococcus aureus* (Khusnan *et al.*, 2008).

Tabel 1. Hasil uji katalase dan pewarnaan Gram isolat *Staphylococcus aureus* hasil isolasi pada media BPA dan EYT

| Kode Isolat | Pengamatan | Uji Katalase | Uji Pewarnaan Gram | |
|-------------|------------|--------------|--------------------|------|
| | | | Morfologi | Gram |
| A | 1 | +++ | Kokus | + |
| | 2 | +++ | Kokus | + |
| B1 | 1 | - | Batang | + |
| | 2 | - | Batang | + |
| | 1 | - | Batang | + |
| B2 | 2 | - | Batang | + |
| | 1 | + | Batang | + |
| B3 | 2 | - | Batang | + |
| | 1 | - | Campuran | Td |
| B4 | 2 | - | Campuran | Td |
| | 1 | - | Campuran | Td |
| B5 | 2 | - | Campuran | Td |
| | 1 | - | Campuran | Td |
| B6 | 2 | - | Campuran | Td |
| | 1 | + | Campuran | Td |
| B7 | 2 | + | Campuran | Td |
| | 1 | +++ | Kokus | + |
| B8 | 2 | +++ | Kokus | + |

Keterangan: Uji katalase : (-) Tidak timbul gelembung, (+) Timbul sedikit gelembung, (++) Timbul gelembung, (+++) Timbul banyak gelembung. Uji Pewarnaan Gram (Gram) : (+) Positif, (-) Negatif, (td) Tidak teridentifikasi

Isolat *S. aureus* yang dipilih untuk diidentifikasi lebih lanjut menggunakan kit API Staph adalah isolat *S. aureus* yang menunjukkan hasil positif pada uji pewarnaan Gram, uji katalase, penanaman pada media BPA dan EYT, penanaman pada media MSA, dan uji koagulase. Isolat *S. aureus* yang terpilih adalah isolat A. Gambar 2 memperlihatkan hasil dari identifikasi lanjut menggunakan kit API Staph. Hasil

dari identifikasi lanjut menggunakan kit API Staph terhadap isolat A menunjukkan persentase kesamaan dengan kultur referensi sebesar 41,8% untuk identifikasi sebagai *Staphylococcus aureus*. Selanjutnya isolat A digunakan untuk analisis penentuan nilai D dan z pada minuman dari gel cinau hijau dan rosela. Nilai D dan z ini merupakan dua parameter penting yang perlu diperhitungkan dalam proses pengolahan pangan mengingat sifat patogen dari bakteri *S. aureus*.

Tabel 2. Hasil uji koagulase dan penanaman pada media MSA isolat *Staphylococcus aureus*

| Kode Isolat | Pengamatan | Uji Koagulase | Uji Penanaman pada MSA |
|-----------------|------------|---------------|------------------------|
| Kontrol negatif | | - | - |
| Kontrol positif | 1 | +3 | + |
| | 2 | +4 | + |
| A | 1 | +2 | + |
| | 2 | +2 | + |
| B8 | 1 | +1 | + |
| | 2 | +1 | + |

Keterangan: Uji Koagulase: (-) Jika koagulan tidak terbentuk, (+1) Jika koagulan tidak terkumpul dan sedikit, (+2) Jika koagulan terkumpul dibagian atas dan sedikit, (+3) Jika koagulan terkumpul dibagian bawah dan banyak, (+4) Jika koagulan pada tabung dibalik tidak jatuh. Uji Penanaman pada MSA: (+) Kuning, (-) Merah



Gambar 2. Hasil uji dengan kit API Staph isolat A

Nilai D isolat *Staphylococcus aureus* A dan ATCC 25923

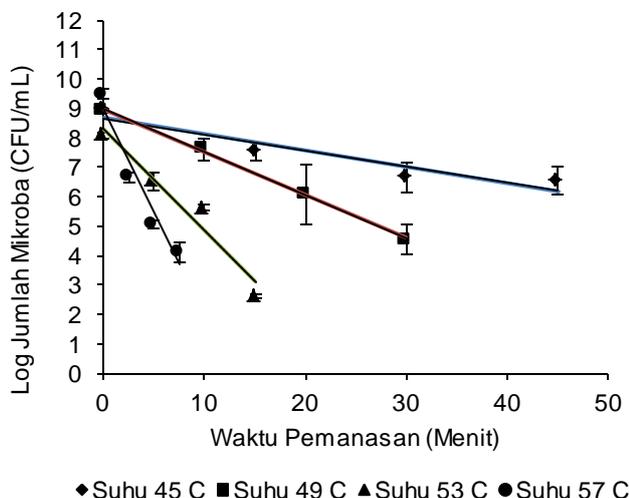
Ketahanan panas mikroba atau sensitifitas panas mikroba oleh suhu pemanasan yang dinyatakan dengan nilai D yang berbeda-beda untuk setiap mikroba (Yuswita, 2014). Nilai D didefinisikan sebagai waktu dalam menit pada suhu tertentu yang diperlukan untuk menurunkan jumlah spora atau sel vegetatif tertentu sebesar 90% atau satu logaritmik. Pengujian ketahanan panas dilakukan terhadap isolat *S. aureus* A dan isoat ATCC 25923 sebagai pembandingan. Gambar 3 dan 4 menunjukkan penurunan logaritmik jumlah mikroba isolat *S. aureus* ATCC 25923 dan isolat *S. aureus* A yang dipanaskan pada suhu konstan 45, 49, 53, dan 57°C (pada selang waktu tertentu) dengan *heating menstruum* minuman gel cinau hijau dan rosela (pH 3,17).

Penurunan jumlah bakteri berbanding lurus terhadap lama waktu pemanasan yaitu semakin lama perlakuan proses pemanasan maka semakin kecil jumlah bakteri yang terhitung. Hal ini sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa laju penurunan jumlah mikroba akan semakin besar jika suhu yang digunakan ditingkatkan (Maldonado *et al.*, 2008). Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa isolat A memiliki nilai D pada suhu 45, 49, 53, dan 57°C berturut-turut sebesar 32,3; 17,9; 4,6; dan 1,5 menit. Isolat ATCC 25923 memiliki nilai D pada suhu 45, 49, 53, dan 57°C berturut-turut sebesar 18,5; 6,8; 2,9 dan 1,4 menit. Data uji ketahanan panas untuk kedua isolat menunjukkan semakin tinggi suhu maka nilai D semakin kecil. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi suhu pemanasan, maka waktu yang diperlukan untuk menginaktivasi mikroba sebesar 1 siklus Log akan semakin singkat (Hawa *et al.*, 2011).

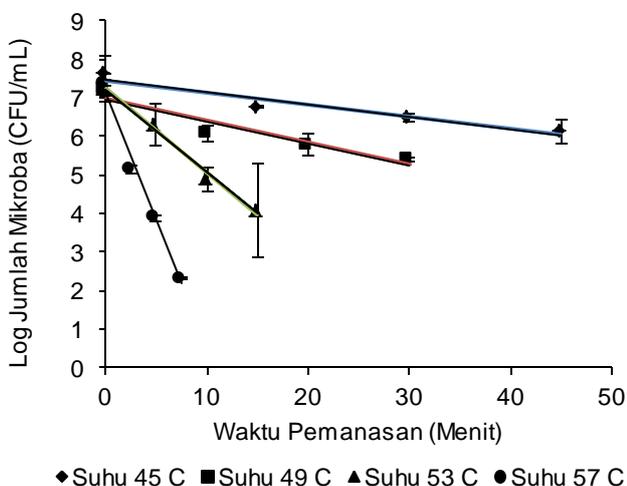
Selain itu, berdasarkan perhitungan terhadap nilai D diketahui bahwa isolat *S. aureus* A memiliki nilai D pada berbagai suhu yang lebih tinggi dibandingkan isolat *S. aureus* ATCC 25923 pada *heating menstruum* minuman dari gel cinau hijau dan rosela. Hal ini menunjukkan bahwa isolat A bersifat lebih tahan panas dibandingkan isolate ATCC. Isolat *S. aureus* ATCC 25923 merupakan isolat klinis yang diisolasi dari tubuh manusia (Widowati *et al.*, 2014), sementara isolat A berasal dari gel cinau hijau di pasaran. Pertumbuhan isolat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 di dalam tubuh manusia berada pada suhu optimum (sekitar 37°C) sehingga tidak memiliki efek ketahanan panas yang tinggi. Proses pengolahan gel cinau hijau menyebabkan adanya seleksi (*screening*) terhadap mikroba, sehingga *S. aureus* yang terisolasi cenderung memiliki ketahanan panas yang lebih tinggi. Mikroorganisme yang diberi kondisi stres dapat menjadi lebih resisten (Cebrián *et al.*, 2010). Selain itu, isolat *S. aureus* A pada *heating menstruum* minuman berada dalam kondisi yang lebih mendekati keadaan aslinya yaitu produk gel cinau hijau (Yuliana, 2008). Hal ini memungkinkan bahwa isolat dari gel cinau hijau tersebut (isolat A) lebih mudah beradaptasi.

Bakteri dengan jumlah yang sama belum tentu dapat direduksi dengan jumlah panas yang sama. Hal ini karena banyak faktor yang mempengaruhi ketahanan panas mikroba antara lain air, lemak, garam, karbohidrat, pH, protein dan komponen lain, jumlah mikroba, umur mikroba, faktor tumbuh, waktu dan suhu, komponen inhibitor, efek ultrasonik (Jay, 2000). *S. aureus* memiliki nilai D_{49} , $D_{54,5}$, dan D_{60} berturut-turut sebesar 9,4; 4,9; dan 1 menit pada pH 4,5 (ICMSF, 2003). Sedangkan nilai D_{49} , $D_{54,5}$, dan D_{60} isolat *S. aureus* pada *heating*

menstruum buffer phosphate (pH 6,5) sebesar 42,1; 11,9; dan 2,5 (ICMSF, 2003).



Gambar 3. Penurunan logaritma jumlah mikroba isolat *S. aureus* ATCC 25923 (Log CFU/mL) yang dipanaskan pada suhu konstan 45, 49, 53, dan 57°C dalam selang waktu tertentu pada *heating menstruum* minuman dari gel cincau hijau dan rosela (pH 3,17)



Gambar 4. Penurunan logaritma jumlah mikroba isolat *S. aureus* A (Log CFU/mL) yang dipanaskan pada suhu konstan 45, 49, 53, dan 57°C dalam selang waktu tertentu pada *heating menstruum* minuman dari gel cincau hijau dan rosela (pH 3,17)

Hal ini menunjukkan bahwa nilai D isolat *S. aureus* uji memiliki nilai yang lebih kecil dibandingkan isolat *S. aureus* pada pH yang lebih tinggi. Nilai pH *heating menstruum* minuman dari gel cincau

hijau dan rosela sekitar 3,17 atau bersifat lebih asam dari nilai pH *heating menstruum buffer phosphate* sekitar 4,5 dan 6,5. pH optimum pertumbuhan *S. aureus* optimum pada pH 6,0-7,0 dimana pada pH optimum pertumbuhan, mikroorganisme biasanya paling resisten terhadap panas atau nilai D relatif besar (Jay, 2000).

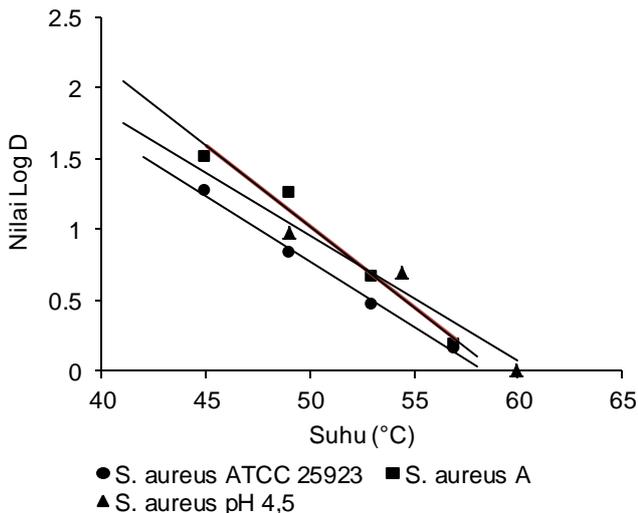
Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan nilai D_{45} , D_{49} , D_{53} , dan D_{57} isolat *S. aureus* A dalam penentuan kecukupan proses pasteurisasi dinilai mampu memberikan jaminan mutu produk yang lebih baik dibandingkan isolat pada *heating menstruum buffer phosphate* (pH 6,5) karena berakibat proses panas menjadi berlebih (*over process*). Perlakuan panas berlebih berpengaruh terhadap kualitas atau mutu produk yang dihasilkan seperti tekstur gel yang terbentuk serta nilai fungsionalnya yaitu jumlah antioksidan maupun senyawa bioaktif lainnya (Achyadi, 2009).

Nilai z isolat *Staphylococcus aureus* A dan ATCC 25923

Nilai z didefinisikan sebagai sensitivitas nilai D terhadap perubahan suhu atau besarnya perubahan suhu (°C) yang diperlukan untuk menurunkan nilai D sebesar satu siklus Log (Herdiana *et al.*, 2014). Berdasarkan nilai D pada suhu percobaan dibuat kurva *thermal death time* (TDT) yang menunjukkan hubungan antara nilai D (dalam menit) pada skala logaritmik dengan suhu (°C). Penentuan nilai z diperoleh dari kurva semi-logaritmik berbentuk linear dengan slope $-1/z$ (Groenewald *et al.*, 2013). Pada Gambar 5 disajikan kurva yang menunjukkan hubungan antara nilai D dengan suhu 49, 54,5, dan 60°C terhadap tiga jenis isolat *S. aureus* pada *heating menstruum*. Kurva ini menunjukkan kecenderungan ketahanan panas mikroba yang dinyatakan dalam nilai z, dimana isolat *S. aureus* A memiliki nilai z sebesar 8,8°C, *S. aureus* ATCC 25923 sebesar 10,8°C, dan *S. aureus* (pH 4,5) sebesar 11,3°C. Terlihat dalam Gambar 5 bahwa untuk isolat *S. aureus* A memiliki kemiringan kurva yang paling curam. Hal ini menunjukkan bahwa nilai z isolat *S. aureus* A paling kecil diantara ketiga isolat tersebut. Kurva yang lebih curam menyebabkan isolat *S. aureus* A pada suhu tertentu dapat memiliki nilai D yang lebih kecil dibandingkan dua isolat lainnya. Penentuan parameter proses termal didasarkan atas nilai D yang dapat menjamin keamanan proses namun tidak berlebihan (*over process*).

Isolat yang diperoleh dari hasil penelitian mempunyai nilai z yang lebih kecil dibandingkan nilai z pigmen (merah dan hijau, *browning*, nutrisi seperti Karoten, Thiamin, dan Asam Askorbat) (Toledo, 2007). Proses pasteurisasi yang umumnya dilakukan pada suhu 85-95°C selama 2-3 detik dapat menyebabkan *over process* jika diterapkan

dalam minuman dari gel cincau hijau dan rosela (Sukasih *et al.*, 2005). Oleh karena itu, nilai z yang lebih kecil berdasarkan hasil penelitian ini mengakibatkan waktu proses pasteurisasi menjadi lebih singkat dengan peningkatan suhu yang tidak terlalu besar namun memiliki efek letalitas yang sama (Juneja *et al.*, 2006). Hal ini sekaligus dapat meminimalkan kerusakan zat gizi yang terkandung dalam produk (Safaryani *et al.*, 2007).



Gambar 5. Kurva ketergantungan nilai D terhadap suhu 45, 49, 53, dan 57°C untuk isolat *S.aureus* A dan ATCC 25923 pada *heating menstruum* minuman dari gel cincau hijau dan rosela (pH 3,17) beserta kurva ketergantungan nilai D terhadap suhu 49, 54,5, dan 60°C untuk isolat *S.aureus* pada *heating menstruum buffer phosphate* (pH 4,5) (ICMSF, 2003)

KESIMPULAN

Isolat *S. aureus* A menunjukkan hasil positif pada uji-uji pewarnaan Gram, uji katalase, uji penanaman pada media BPA dan EYT, uji penanaman pada media MSA, uji koagulase, serta memiliki persentase kesamaan dengan kultur referensi 41,8% menggunakan kit API Staph. Isolat A memiliki nilai D_{45} , D_{49} , D_{53} dan D_{57} pada *heating menstruum* berturut-turut sebesar 32,3; 17,9; 4,6; dan 1,5 menit. Sementara isolat ATCC 25923 yang merupakan isolat klinis dari *S. aureus* memiliki nilai D_{45} , D_{49} , D_{53} dan D_{57} berturut-turut sebesar 18,5; 6,8, 2,9; dan 1,4 menit. Nilai z isolat A yang lebih kecil dibandingkan isolat ATCC 25923 (referens) menunjukkan bahwa dengan proses pasteurisasi dapat

dipercepat dengan sedikit meningkatkan suhu proses tanpa mempengaruhi keamanan dan mutu produk.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Achyadi NS. 2009. Kajian pengaruh jenis dan konsentrasi bahan penggumpal terhadap karakteristik gel cincau titam (*Mesona palustris*). J Teknol Insentif 3: 1-47.
- Atiqoh H, Wardani RS, Meikawati W. 2011. Uji antidiabetik infusa kelopa bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) pada tikus putih jantan galur wistar yang diinduksi glukosa. J Kesehatan Masyarakat Indonesia 7: 43-50.
- [BSN] Badan Standarisasi Nasional. 2011. Cara uji Mikrobiologi-Bagian 9: Penentuan *Staphylococcus aureus* pada Produk Perikanan. Jakarta (ID): BSN.
- Bahçeci KS, Acar J. 2007. Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestis*. Int J Food Microbiol 120: 266-273.
- Bennett RW, Lancette GA. 2001. *Staphylococcus aureus*, Chapter 12. In FDA Bacteriological Analytical Manual, 8th ed., Rev. A. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Cebrián G, Sagarzazu N, Pagán R, Condón S, Mañas P. 2010. Development of stress resistance in *Staphylococcus aureus* after exposure to sublethal environmental conditions. Int J Food Microbiol 140: 26-33. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.017.
- Darusman F, Saptarini NM, Priatna B. 2012. Aktivitas anti-inflamasi ekstrak kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa*. J Medika Planta 1: 18-23.
- Dewi AK. 2013. Isolasi, identifikasi dan uji sensitivitas *Staphylococcus aureus* terhadap amoxicillin dari sampel susu kambing peranakan *ettawa* (PE) penderita mastitis di wilayah Girimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta. J Sain Veteriner 31: 138-151.
- Fraiha M, Ferraz ACO, Biagi JD. 2010. Determination of thermobacteriological parameters and size of *Bacillus stearother-*

- mophilus* ATCC 7953 spores. Food Sci Technol 30: 1041-1045. DOI: 10.1590/S0101-2061201000032.
- Groenewald WH, Gouws PA, Witthuhn RC. 2013. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores isolated from a fruit processing plant and grape juice concentrate in South Africa. Afr J Microbiol Res 7: 2736-2740. DOI: 10.5897/AJMR12.1789.
- Karlina CY, Ibrahim M, Trimulyono G. 2013. Aktivitas antibakteri ekstrak herba krokot (*Portulaca oleracea* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Lentera Bio 2: 87-93.
- Koop G, Visscher AD, Collar CA, Bacon DAC, Maga EA, Murray JD, Karlien S, Vleighter SD, Haesebrouck F, Rowe JD. 2012. Identification of coagulase-negative staphylococcus species from goat milk with the API staph identification test and with transfer RNA-intergenic spacer PCR combined with capillary-electrophoresis. J Dairy Sci 95: 7200-7205. DOI: 10.3168/jds.2012-5747.
- Handayani BR, Werdiningsih W. 2010. Kondisi sanitasi dan keracunan makanan tradisional. J Agroteksos 20: 131-139.
- Hardiningsih R, Naputupulu RNR, Yulinery T. 2006. Isolasi dan uji resistensi beberapa isolat pada pH rendah. J Biodiversitas 7: 15-17. DOI: 10.13057/biodiv/d070105.
- Hawa LC, Susilo B, Jayasari NE. 2011. Studi komparasi inaktivasi *Escherichia coli* dan perubahan sifat fisik pada pasteurisasi susu sapi segar menggunakan metode pemanasan dan tanpa pemanasan dengan kejut medan listrik. J Teknol Pertanian 12: 31-39.
- Herdiana DD, Utami R, Anandito BK. 2014. Kinetika degradasi termal aktivitas antioksidan pada minuman tradisional wedang uwuh siap minum. J Teknosains Pangan 3: 46-53.
- Huda C, Salni, Melki S. 2012. Penapisan aktivitas antibakteri dari bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak *Sarcophyton* sp. Maspari J 4: 69-76.
- Huang L. 2013. Determination of thermal inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* in chicken meats by isothermal and dynamic methods. Food Control 33: 484-488. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.03.049.
- [ICMSF] International Commission Microbiological Specification for Food. 2003. Microorganisms in Foods 5: Characteristics of Microbial Pathogens. London (UK): Kluwer Academic/Plenum Publisher.
- Jay JM. 2000. Modern Food Microbiology 6th Edition. Gaithersburg, Maryland (US): Aspen Publishers, Inc.
- Juneja VK, Eblen BS, Ransom GM. 2006. Thermal inactivation of *Salmonella* spp. in chicken broth, beef, pork, Turkey, and chicken: determination of D- and Z-values. J Food Sci 66: 146-152. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2001.tb15597.x.
- Khusnan, Salasia SIO, Soegiyono. 2008. Isolasi, identifikasi, karakterisasi bakteri *Staphylococcus aureus* dari limbah penyembelihan dan karkas ayam potong. J Veteriner 9: 45-41.
- Krapf T, Gantenbein-Demarchi C. 2010. Thermal inactivation of *Salmonella* spp. during conching. LWT-Food Sci Technol: 43: 720-723. DOI: 10.1016/j.lwt.2009.10.009.
- Maldonado MC, Belfiore C, Navarro AR. 2008. Temperature, soluble solids and pH effects on *Alicyclobacillus acidoterrestris* viability in lemon juice concentrate. J Ind Microbiol Biotechnol 35: 141-144.
- Meliawaty F. 2012. Efisiensi sterilisasi alat bedah mulut melalui inovasi oven dengan ozon dan infrared. J Kedokteran Maranatha 11: 147-167.
- Nurdin SU. 2007. Evaluasi efek laksatif dan fermentabilitas komponen pembentuk gel daun cincau hijau (*Premna oblongifolia* Merr.). J Teknol Industri Pangan 13: 10-16.
- Nurdin SU, Suharyono, Rizal S. 2008. Karakteristik fungsional polisakarida pembentuk gel daun cincau hijau (*Premna oblongifolia* Merr.). J Teknol Industri Hasil Pertanian 13: 4-9.
- Pramitasari N. 2012. Cemar Mikrobiologis pada Cincau Hijau (*Premna oblongifolia* Merr.) serta Evaluasi Sanitasi dan Higiene pada Penjual Cincau Hijau di Wilayah Bogor. [Skripsi]. Bogor (ID): Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Prangdimurti E, Herawati D, Firlieyanti AS, Briantoto RD. 2014. Perubahan mutu fisik dan mikrobiologi gel cincau hija kemasan selama penyimpanan. J Mutu Pangan 1: 40-45.
- [PHE] Public Health England. 2014. Catalase test, coagulase test, staining procedures: UK standards for microbiology investigations TP 8 Issue3. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>. [17 Januari 2015].
- Purwohadisantoso K, Zubaidah E, Saparianti E. 2009. Isolasi bakteri asam laktat dari sayur

- kubis yang memiliki kemampuan penghambatan bakteri patogen (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella thypimurium*). J Teknol Pertanian 10: 19-27.
- Safaryani N, Haryanti S, Hastuti ED. 2007. Pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap penurunan kadar vitamin C brokoli (*Brassica oleracea* L.). Bul Anatomi Fisiologi 15: 1-7.
- Shields P, Tsang AY. 2006. Mannitol salt agar plates protocols. Protocols. American Society for Microbiology, Washington, DC. www.microbelibrary.org. [14 Januari 2015].
- Shimamura Y, Kidokoro S, Murata M. 2006. Survey and properties of *Stapylococcus aureus* isolated from Japanessed-style dessert. Bioscie Biotecnol Biochem 70: 1571-1577.
- Sugito. 2011. Pemanfaatan cincau hijau sebagai pangan fungsional antitumor, antioksidan biologis dan peningkat sistem imun tubuh. J Pembangunan Manusia 5: 1-12.
- Sukasih E, Setyadjit, Hariyadi RD. 2005. Analisis kecukupan panas pada proses pasteurisasi puree manga (*Mangifera indica* L.). J Pascapanen 2: 8-17.
- Sukasih E, Prabawati S, Hidayat T. 2009. Optimasi kecukupan panas pada pasteurisasi santan dan pengaruhnya terhadap mutu santan yang dihasilkan. J Pascapanen 6: 34-42.
- Susantikam Ploypailin. 2014. Characteristic of Canned Green Grass Jelly in Rosela [Thesis]. Bogor (ID): Faculty of Agricultural and Engineering, Bogor Agricultural University.
- Rosida, Susiloningsih EKB. 2007. Pengaruh konsentrasi starter *Lactobacillus plantarum* dan lama fermentasi terhadap kualitas dan kerusakan produk terasi. FTI UPN Veteran Jawa Timur 15: 72-76.
- Tille P. 2012. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 13th Edition. Canada: Elsevier Canada.
- Toledo RT. 2007. Fundamentals of Food Process Engineering 3rd. Georgia (US): Springer.
- Widowati TW, Hamzah B, Wijaya A, Pambayun R. 2014. Sifat antagonistic *Lactobacillus* sp. B441 dan I442 asal tempoyak terhadap *Staphylococcus aureus*. Agr J 34: 430-438.
- Yuliana N. 2008. Kinetika pertumbuhan bakteri asam laktat isolate T5 yang berasal dari tempoyak. J Teknol Industri dan Hasil Pertanian 13: 108-116.
- Yulvizar C, Dewiyanti I, Defira CN. 2014. Seleksi bakteri berpotensi probiotik dari ikan mas (*Cyprinus carpio*) indigenous jantho berdasarkan aktivitas antibakteri secara *in vitro*. J Teknol Industri Pertanian Indonesia 6: 20-24.
- Yuswita E. 2014. Optimasi proses termal untuk membunuh *Clostridium botulinum*. J Aplikasi Teknol Pangan 3: 5-6.